

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-012300  
 (43)Date of publication of application : 20.01.1986

(51)Int.Cl.

C12Q 1/48  
 G01N 33/50

(21)Application number : 59-133699

(71)Applicant : FUJIREBIO INC

(22)Date of filing : 28.06.1984

(72)Inventor : MIYAGAWA EIJI  
 MOTOKI YOSHINOBU

## (54) DETERMINATION OF PYROPHOSPHORIC ACID USING ENZYME

## (57)Abstract:

PURPOSE: To determine pyrophosphoric acid, accurately with simple procedure, by reacting pyrophosphoric acid with pyruvate orthophosphate dikinase in the presence of phosphoenolpyruvic acid and adenosine monophosphate. CONSTITUTION: 1 $\mu$ mol of pyrophosphoric acid (or specimen containing the same) is added with a mixture of 10W20 $\mu$ mol of phosphoenolpyruvic acid, 10W20 $\mu$ mol of adenosine monophosphate and 5W10 OU of pyruvate orthophosphate dikinase obtained from a microbial strain such as Acetobacter xylinum or from a certain kind of sappy plant which is an intermediate type between C3 and C4 plants. The pH of the mixture is adjusted to 5W8, and the components are made to react with each other at 20W45 $^{\circ}$  C for 20W30min to obtain phosphoric acid, pyruvic acid and adenosine triphosphate. In the above products, pyruvic acid is treated with lactate dehydrogenase in the presence of NADH, and the amount of produced pyruvic acid is determined by the colorimetric determination of the amount of consumed NADH. The amount of pyrophosphate can be calculated therefrom.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A)

昭61-12300

⑫ Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和61年(1986)1月20日

C 12 Q 1/48

G 01 N 33/50

8213-4B

Z-8305-2G

審査請求 未請求 発明の数 3 (全 5頁)

⑭ 発明の名称 酵素を用いたピロリン酸の測定方法

⑮ 特 願 昭59-133699

⑯ 出 願 昭59(1984)6月28日

⑰ 発 明 者 宮 川 英 二 宇部市大字中野開作字七の割464-1 富士レビオ株式会社  
社宇部研究所内

⑱ 発 明 者 元 木 義 信 宇部市大字中野開作字七の割464-1 富士レビオ株式会社  
社宇部研究所内

⑲ 出 願 人 富士レビオ株式会社 東京都新宿区下落合4丁目6番7号

⑳ 代 理 人 弁理士 田中 政浩

明 細 書

1 発明の名称

酵素を用いたピロリン酸の測定方法

2 特許請求の範囲

1 ピロリン酸にホスホエノールピルビン酸及びアデノシン二リン酸の存在下でピルベートオルソフォスフェートシキナーゼを作用させることを特徴とするピロリン酸の測定方法

2 ピロリン酸にシチジン二リン酸グリセロールの存在下でグリセロール-3-フォスフェートシチジルトランスフェラーゼを作用させることを特徴とするピロリン酸の測定方法

3 ピロリン酸にシチジン二リン酸リビトールの存在下でリビトール-5-フォスフェートシチジルトランスフェラーゼを作用させることを特徴とするピロリン酸の測定方法

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はピロリン酸を酵素を用いて測定する方法に関するものである。

(従来の技術)

従来、ピロリン酸の測定方法としては、

Grindleyらの化学的方法(G. B. Grindley and C. A. Nichol, Anal. Biochem., vol 33, p114

(1970))が感度がよいところから多用されていた。

(発明が解決しようとする問題点)

しかしながら、この方法には、発色剤がリン酸とも反応するため試料から予めリン酸を除去する必要があり、また、有機酸を使用するためその取扱いに注意する必要があるという欠点があった。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らはこのような問題のないピロリン酸の測定方法を開発すべく鋭意検討の結果、酵素を利用した三種のピロリン酸の測定方法を開発するに至り、これはいずれもこれらの問題がないばかりでなく、特異性が高く操作が簡単であるなど種種の利点を有することを見い出して本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、(1)ピロリン酸に、ホスホエノールピルビン酸及びアデノシン二リン酸の存

低下でビルベートオルソフォスフェートシキナーゼを作用させることを特徴とするピロリン酸の測定方法、(2)ピロリン酸にシチジン三リン酸グリセロールの存在下でグリセロール-3-フォスフェートシチジルトランスフェラーゼを作用させることを特徴とするピロリン酸の測定方法、並びに(3)ピロリン酸にシチジン三リン酸リビトールの存在下でリビトール-5-フォスフェートシチジルトランスフェラーゼを作用させることを特徴とするピロリン酸の測定方法に関するものである。

以下、本発明の方法を順に説明する。

本発明の方法の測定対象はピロリン酸であるが測定試料はこれを含むものであれば特に制限されるものではない。しかしながら、本発明の方法は本発明者らがシアル酸の定量方法としてシチジン三リン酸の存在下でアシルノイラミン酸シチジルトランスフェラーゼを利用する方法を開発する一環として開発されたものであり、従って、例えばシアル酸を含む血清にシチジン三リン酸の存在下でアシルノイラミン酸シチジルトランス

フェラーゼを作用させて得たピロリン酸含有液は測定試料として好適である。

第1の方法は、このように試料にホスホエノールビルビン酸及びアデノシン三リン酸の存在下でビルベートオルソフォスフェートシキナーゼ(EC. 2.7.9.1)を作用させる方法である。

ビルベートオルソフォスフェートシキナーゼはアセトバクター・キシリナム、プロピオニバクテリウム・シェルマニイ、バクテロイダス・シムビオサスなどの微生物、C<sub>3</sub>とC<sub>4</sub>植物の中間型である多汁植物のある種、トラモロコシの葉などから公知の方法で取得することができる。

試料にホスホエノールビルビン酸とアデノシン三リン酸及びビルベートオルソフォスフェートシキナーゼを添加する順序は問うところではなく、いずれを先に加えてもよいが、通常はこれらを混合物として添加すればよい。試料中に既に必要量のホスホエノールビルビン酸又はアデノシン三リン酸が含まれている場合には新たに添加する必要がないことはもとよりである。

これらの添加量は、通常は試料中のピロリン酸1  $\mu$ moleに対して、ホスホエノールビルビン酸10~20  $\mu$ mole程度、アデノシン三リン酸10~20  $\mu$ mole程度、そして、ビルベートオルソフォスフェートシキナーゼ5~10 U程度が適当である。これらの濃度は使用機器などに応じて適当に定めればよい。

反応条件としては、ビルベートオルソフォスフェートシキナーゼの作用しやすい条件がよく、従ってこの酵素の理化学的性質によるが、通常はpH 5~8程度、温度20~45℃程度で20~30分間程度反応させればよい。

この酵素反応によって、ピロリン酸、ホスホエノールビルビン酸及びアデノシン三リン酸が反応してリン酸、ビルビン酸及びアデノシン三リン酸を生成するので、ホスホエノールビルビン酸あるいはアデノシン三リン酸の減少量を測定するか、又は、リン酸、ビルビン酸あるいはアデノシン三リン酸の生成量を測定することによってピロリン酸を定量することができる。これらの測定方法は

各化合物について種々知られているが、本発明者らは簡便でありかつ夾雑物の影響を受けない方法としてビルビン酸の生成量を測定する次の2つの方法を案出した。

ビルビン酸の生成量を測定する第1の方法は、NADHの存在下でラクトートデヒドロゲナーゼ(EC 1.1.1.27)を作用させてNADHの減少を比色定量する方法である。ラクトートデヒドロゲナーゼは動物の心臓、肝臓、腎臓、筋肉、血球などに分布しているのでこれらから、例えば豚の心臓から抽出してもよいが、市販品があるのでそれをそのまま用いるのが好都合である。

ラクトートデヒドロゲナーゼの添加量は測定試料中のピロリン酸1  $\mu$ moleに対して5~10 U程度が適当であり、NADHは2~4  $\mu$ mole程度が適当である。これらは試料にビルベートオルソフォスフェートシキナーゼを加える際に一併に加えることによって各酵素反応を連続的に行なわせることができる。その結果、1操作で比色定量することができる。しかしながら、各酵素を順次添加しても

よいことはもとよりである。反応条件はラクトーテグヒドロゲナーゼの作用しやすい条件がよく、従って、この酵素の理化学的性質によるが、通常はpH 5~8程度、温度20~45℃程度で20~30分間程度反応させればよい。この反応による340 nm付近の吸光度変化を測定することによって比色定量することができる。

ピルビン酸の生成量を測定するもうひとつの方法は、生成したピルビン酸にピルベートオキシダーゼ( EC 1.2.3.3 )を作用させて生成する過酸化水素を色素に導き比色定量する方法である。ピルベートオキシダーゼは市販品があるのでそれをそのまま使用すればよい。

ピルベートオキシダーゼの添加量は測定試料中のピロリン酸1  $\mu$ mole に対して5~10 U程度が適当であり、パーオキシダーゼは20~30 U程度が適当である。これらは試料にピルベートオルソフスフェートシキナーゼを加える際に一緒に加えることによって各酵素反応を連続的に行なわせることができ、その結果、1操作で比色定量す

ることができる。しかしながら、各酵素を順次添加してもよいことはもとよりである。反応条件はこれらの酵素の作用しやすい条件がよく、従って、これらの酵素の理化学的性質によるが、通常はpH 5~8程度、温度20~45℃程度で20~30分間程度反応させればよい。比色定量は505 nm付近の吸光度変化を測定すればよい。

第2の方法は測定試料にシチシンニリングリセロールの存在下でグリセロール-3-フォスフェートシチジルトランスフェラーゼ( EC 2.7.7.39 )を作用させる方法である。

グリセロール-3-フォスフェートシチジルトランスフェラーゼはラクトバチルス・プランタルム、スタフィロコッカス・アクレウス、バチルス・ズブチリスなどに存在が知られているのでこれらを培養して取得することもできるが、市販品があるのでそれをそのまま利用することもできる。

試料にシチシンニリン酸グリセロール及びグリセロール-3-フォスフェートシチジルトランスフェラーゼを添加する順序は問うところではなく、

いずれを先に加えてもよいが、通常はこれらを混合物として添加すればよい。試料中に既に必要量のシチシンニリン酸グリセロールが含まれている場合には新たに添加する必要がないことはもとよりである。

これらの添加量は通常は試料中のピロリン酸1  $\mu$ mole に対して、シチシンニリン酸グリセロール5~10  $\mu$ mole 程度そしてグリセロール-3-フォスフェートシチジルトランスフェラーゼ10~20 U程度が適当である。これらの濃度は使用機器などに応じて適当に定めればよい。

反応条件としては、グリセロール-3-フォスフェートシチジルトランスフェラーゼの作用しやすい条件がよく、従ってこの酵素の理化学的性質によるが、通常はpH 5~8程度、温度20~45℃程度で20~30分間程度反応させればよい。

この酵素反応によって、ピロリン酸とシチシンニリン酸グリセロールとが反応してシチシンニリン酸及びグリセロール三リン酸を生成するので、シチシンニリン酸グリセロールの減少量を測定す

るか、又は、シチシンニリン酸あるいはグリセロール三リン酸の生成量を測定することによってピロリン酸を定量することができる。これらの測定方法は各化合物について種々知られているが、本発明者らは簡便でありかつ夾雑物の影響を受けない方法としてグリセロール三リン酸の生成量を測定する次の2つの方法を出した。

グリセロール三リン酸の生成量を測定する第1の方法はNAD(P)の存在下でグリセロール-3-フォスフェートデヒドロゲナーゼ( EC 1.1.1.4, EC 1.1.1.94 )を作用させてNAD(P)Hの増加を比色定量する方法である。グリセロール-3-フォスフェートデヒドロゲナーゼは、兔筋肉等から抽出しあるいは酵母から得られることが知られており、これらの公知の方法によって調製してもよいが、この酵素は市販されているのでそれをそのまま利用することもできる。

存在させるNAD(P)はNADあるいはNADPのいずれであってもよい。グリセロール-3-フォスフェートデヒドロゲナーゼの添加量は測定試料中のピ

ピロリン酸 1  $\mu$  mole に対して 10 ~ 20 U 程度が適当であり、NAD 又は NADP は 2 ~ 4  $\mu$  mole 程度が適当である。これらは試料にグリセロール-3-フォスフェートシチジルトランスフェラーゼを加える際に一緒に加えることによって各酵素反応を連続的に行なわせることができ、その結果、1 操作で比色定量することができる。しかしながら、各酵素を順次添加してもよいことはもとよりである。反応条件はグリセロール-3-フォスフェートデヒドロゲナーゼの作用しやすい条件がよく、従って、この酵素の理化学的性質によるが、通常は pH 5 ~ 8 程度、温度 20 ~ 45 °C 程度で 20 ~ 30 分間程度反応させればよい。この反応による 340 nm 付近の吸光度変化を測定することによって比色定量することができる。

グリセロール三リン酸の生成量を測定するもうひとつの方法は、生成したグリセロール三リン酸にグリセロール-3-フォスフェートオキシダーゼを作用させて生成する過酸化水素を色素に導きこれを比色定量する方法である。グリセロール-

3-フォスフェートオキシダーゼは *Streptococcus*、*Aerococcus* などの微生物を培養することによって製造されており、市販品をそのまま利用することができる。

グリセロール-3-フォスフェートオキシダーゼの添加量は測定試料中のピロリン酸 1  $\mu$  mole に対して 10 ~ 20 U 程度が適当であり、パーオキシダーゼは 20 ~ 30 U 程度が適当である。これらは試料にグリセロール-3-フォスフェートシチジルトランスフェラーゼを加える際に一緒に加えることによって各酵素反応を連続的に行なわせることができ、その結果、1 操作で比色定量することができる。しかしながら、各酵素を順次添加してもよいことはもとよりである。反応条件はこれらの酵素の作用しやすい条件がよく、従って、これらの酵素の理化学的性質によるが、通常は pH 5 ~ 8 程度、温度 20 ~ 45 °C 程度で 20 ~ 30 分間程度反応させればよい。比色定量は 505 nm 付近の吸光度変化を測定すればよい。

第3の方法は測定試料にシチジン二リン酸リビトールの存在下でリビトール-5-フォスフェ-

ートシチジルトランスフェラーゼ (EC 2.7.7.40) を作用させる方法である。

リビトール-5-フォスフェートシチジルトランスフェラーゼは *Staphylococcus aureus*、*Probiobacterium*、*Shewanella*、*Streptococcus lactis*、*Bacillus subtilis* など存在することが知られており、これらを培養して公知の方法で取得することができる。

試料にシチジン二リン酸リビトールとリビトール-5-フォスフェートシチジルトランスフェラーゼを添加する順序は問うところではなく、いずれを先に加えてもよいが、通常はこれらを混合物として添加すればよい。試料中に既に必要量のシチジン二リン酸リビトールが含まれている場合には新たに添加する必要はないことはもとよりである。

これらの添加量は通常は試料中のピロリン酸 1  $\mu$  mole に対して、シチジン二リン酸リビトール 10 ~ 20  $\mu$  mole 程度そしてリビトール-5-フォスフェートシチジルトランスフェラーゼ 10 ~

20 U 程度が適当である。これらの濃度は使用機材などに応じて適当に定めればよい。

反応条件としては、リビトール-5-フォスフェートシチジルトランスフェラーゼの作用しやすい条件がよく、従ってこの酵素の理化学的性質によるが、通常は pH 5 ~ 8 程度、温度 20 ~ 45 °C 程度で 20 ~ 30 分間程度反応させればよい。

この酵素反応によって、ピロリン酸とシチジン二リン酸リビトール-5-リン酸とが反応してシチジン三リン酸及び D-リビトール-5-リン酸を生成するので、シチジン二リン酸リビトール-5-リン酸の減少量を測定するか、又は、シチジン三リン酸あるいは D-リビトール-5-リン酸の生成量を測定することによってピロリン酸を定量することができる。これらの測定方法は各化合物について種々知られているが、本発明者らは簡便でありかつ夾雑物の影響を受けない方法として D-リビトール-5-リン酸の生成量を測定する方法を案出した。

その方法は、生成した D-リビトール-5-リ

ン酸にNAD(P)の存在下でリビトール-5-フوسفエートデヒドロゲナーゼ (EC 1.1.1.137) を作用させてNAD(P)Hの増加を比色定量する方法である。リビトール-5-フوسفエートデヒドロゲナーゼはラクトバチルス・プランタム及び同カセイに存在することが知られており、これらを培養して公知の方法で取得することができる。

存在させるNAD(P)はNADあるいはNADPのいずれであってもよい。リビトール-5-フوسفエートデヒドロゲナーゼの添加量は測定試料中のピロリン酸1  $\mu$ moleに対して10~20 U程度が適当であり、NAD又はNADPは2~4  $\mu$ mole程度が適当である。これらは試料にリビトール-5-フوسفエートシチジルトランスフェラーゼを加える際に一緒に加えることによって各酵素反応を連続的に行なわせることができ、その結果、1操作で比色定量することができる。しかしながら、各酵素を順次添加してもよいことはもとよりである。反応条件はリビトール-5-フوسفエートシチジルトランスフェラーゼの作用しやすい条件がよく、

従って、この酵素の理化学的性質によるが、通常はpH 5~8程度、温度20~45℃程度で20~30分間程度反応させればよい。この反応による340 nm付近の吸光度変化を測定することによって比色定量することができる。

以上の各方法のいずれにおいてもシアル酸を測定する場合にはアシルノイラミン酸シチジルトランスフェラーゼ又はシチジン三リン酸を添加する際に各酵素の全部又は1部を一緒に添加することによって操作をより簡単に行なうことができる。

(作用及び発明の効果)

本発明の方法は操作が簡単であり、しかもピロリン酸を正確に定量することができるという利点を有する。

(実施例)

実施例 1

Pyruvate orthophosphate dikinase 100 U、  
Lactate dehydrogenase 200 U、ホスホエノールピルビン酸50  $\mu$ mole、アデノシン二リン酸50  $\mu$ mole、還元型ニコチンアデノシンジヌクレ

オチド (NADH) 1  $\mu$ moleを含む0.1 Mトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 2 mlに濃度既知のピロリン酸溶液1 mlを加え、37℃で30分間反応させた後、340 nmで比色定量した。その時のピロリン酸の検量線を第1図に示す。

実施例 2

glycerol-3-phosphate cytidyltransferase 100 U、glycerol-3-phosphate dehydrogenase 200 U、シチジン三リン酸グリセロール50  $\mu$ mole、酸化型ニコチンアデノシンジヌクレオチド (NAD) 1  $\mu$ moleを含む、0.1 Mトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 2 mlに濃度既知のピロリン酸溶液1 mlを加え、37℃で30分間反応させた後、340 nmで比色定量した。その時のピロリン酸の検量線を第2図に示す。

4 図面の簡単な説明

第1図及び第2図はいずれも本発明の方法で測定して得られたピロリン酸の濃度と吸光度との関係を示すものである

